

兽药磺胺二甲嘧啶在土壤中的生态行为*

王冉^{1,2} 刘铁铮² 耿志明² 陈明² 王恬^{1†}

(1 南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

(2 江苏省农业科学院, 江苏省畜禽产品安全性研究重点实验室, 南京 210014)

摘要 通过室内培养和土壤薄层层析等实验方法, 研究了磺胺二甲嘧啶对土壤微生物的毒性及其在土壤中的降解、迁移特性。结果显示: 在土壤磺胺二甲嘧啶浓度为 1 mg kg^{-1} 时, 土壤中细菌和真菌数量明显减少 ($p < 0.05$), 但随时间延长, 该抑制作用变缓; 磺胺二甲嘧啶在土壤中降解缓慢, 持留时间久, 在灭菌土和未灭菌土中的半衰期分别为 223.9 d 和 102.4 d, 并容易在土壤中迁移和渗漏, 迁移系数 R_f 大于 0.7, 迁移和渗漏速度受介质 pH 的影响, 在非中性环境下, 移动和渗漏能力增强。表明磺胺二甲嘧啶是一种在土壤中不易被降解、容易迁移和渗漏到水体、对土壤微生物和水体产生危害的新型污染源。

关键词 兽药抗生素; 磺胺二甲嘧啶; 微生物毒性; 生态转移

中图分类号 Q143; S154.1 文献标识码 A

长期以来, 兽药抗生素被大量应用于动物疾病的治疗和预防, 并作为动物生长促进剂以亚治疗剂量添加到动物饲料中长期应用于动物生产。据不完全统计^[1], 我国每年约有近 7 000 t 的兽药抗生素用于动物生产, 而这些药物不能被动物全部吸收, 约有 75% 以上甚至更多的以原药及其代谢产物的形式经由动物粪尿排入环境。这些药物随动物粪便作为肥料施用于农田, 对农田生态造成污染, 影响土壤微生物和农田良性循环, 并在环境中产生大量耐药致病菌, 最终将影响人类的健康^[2~4]。因此, 兽药抗生素对环境生物的毒性日益受到人们的关注。

磺胺类药物是畜牧生产上常用兽药抗生素, 同时作为饲料添加剂和治疗药物被长期大量使用, 对保护动物健康和预防疾病、促进生长有显著作用^[5]。研究表明^[6], 磺胺类药物不能被动物全部吸收, 约有 50% ~ 90% 以原药及其代谢产物的形式经由动物粪尿排入环境, 新鲜猪粪中检测到 $20 \sim 40 \text{ mg kg}^{-1}$, 每亩农田每年将有高达几百克的磺胺类药物被施入^[7], 但关于其在土壤中的转移和对土壤生物毒性的研究还鲜有报道。本实验拟以磺胺二甲嘧啶为例研究探讨磺胺类药物的土壤生物毒性及其在土壤中的生态转移, 以期能为评价兽药抗生素的环境风险评价提

供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

供试土壤于 2004 年 8 月采自江苏省农业科学院试验农田(南京市东郊孝陵卫地区)黄棕壤。采集蔬菜试验田的表层土壤(0~15 cm)于保鲜袋中, 带回实验室, 过筛(孔径 2.0 mm)。贮存于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 个月内使用。土壤样品的基本性质为: 有机质 36.4 g kg^{-1} , 粘粒 241.8 g kg^{-1} , 砂粒 5.3 g kg^{-1} , 粉砂 753 g kg^{-1} , pH 5.53, 水分 117 g kg^{-1} 。

1.2 供试主要药品和仪器

磺胺二甲嘧啶, 标准品, 纯度 97.5% (美国 Sigma 公司提供); 高效液相色谱仪, 配紫外检测器(美国 Agilent 1100S)。

1.3 试验方法

1.3.1 磺胺二甲嘧啶的土壤微生物毒性实验 先称取一定量干土, 加入磺胺二甲嘧啶的丙酮储备液, 使兽药浓度为 500 g kg^{-1} (干土), 放入通风柜待丙酮挥发完后使用。称 6 份 500 g (湿度 17.4%, 干基) 试验处理土样, 分别用于测定土壤中细菌和真菌数量, 另取 3

* 科技部食品安全重大专项江苏省科技厅配套基金项目开放课题(BM2003203)

† 通讯作者, 教授, 博士生导师, E-mail: tianwang@njau.edu.cn

作者简介: 王冉(1973~), 女, 助理研究员, 博士, 主要从事畜产品安全及兽药抗生素的环境安全性评价。E-mail: ranwang2005@hotmail.com; 电话: 025-84391617

收稿日期: 2005-11-04; 收到修改稿日期: 2006-03-03

份土样作为对照。具体过程简述如下:在待培养的土壤中加入 10.0 g 兽药磺胺二甲嘧啶浓度为 500 g kg^{-1} 的干土,每份土样中最终药物浓度为 1.0 mg kg^{-1} ,对照土样不加药。搅拌后连续过筛 5 次使兽药均匀混合,然后装入 1 L 的烧杯,加入灭菌去离子水调节土壤含水量为最大持水量 60%,搅拌均匀,用聚乙烯薄膜封口,在塑料膜上刺一些小孔供透气用。放入 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱避光培养,每隔一定时间进行称重,加水保持土壤含水量,并在处理的第 0、7、15、23 和 35 天称取约 30 g 湿土测定土壤细菌和真菌总数,在加药前测定的细菌和真菌数量为第 0 天的值。

1.3.2 土壤中兽药的降解实验 称 100.0 g 风干土壤,置于 500 ml 棕色广口瓶中。试验设自然土壤及灭菌土壤两个处理。高温高压灭菌。灭菌土在无菌操作下加入灭菌水,自然土加自来水,分别调节土壤至田间最大持水量的 60%。塞上棉塞,在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 生化培养箱中预培养 1 周。然后分别加入 $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ 的磺胺二甲嘧啶标准液 5 ml,使土样的药物最终浓度为 5 mg kg^{-1} ,灭菌处理组在无菌条件下操作,混匀。于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱中继续培养,采用称总重法每周调节土壤含水量一次,使之保持恒定。于加药当天及以后定期取样进行分析测定土壤中磺胺二甲嘧啶的残留量。

1.3.3 磺胺二甲嘧啶在土壤中的迁移模拟试验 称取 20.0 g 土样,加适量去离子水,调成稀泥浆,涂布在层析板($24 \text{ cm} \times 10 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$)上,厚度为 0.5 mm,薄板在室温放置 24 h 风干。用微量移液管吸 50 μl 的 2 mg ml^{-1} 的磺胺二甲嘧啶-丙酮溶液,平行点在层析板下端 2.0 cm 处。待丙酮挥发后,在层析缸中分别加入适量 pH 为 2、6、7 和 10 的去离子水展开剂,将点好样的土壤薄板倾斜置于缸内,倾斜角度约为 30° ,板下端淹水 0.5 cm 以下,在室温下展开。当展开剂到达前沿时,取出薄板,测量展开剂前沿距离,放置于室温下干燥 2 h。以 2 cm 分段割取土壤样品,供分析测试。

1.3.4 磺胺二甲嘧啶在土壤中的渗漏试验 在江苏省农业科学院蔬菜试验田(南京市东郊孝陵卫地区的黄棕壤)选面积为 6 m^2 ($2 \text{ m} \times 3 \text{ m}$) 的小区 2 块,小区四周筑田埂,分别施用含磺胺二甲嘧啶 10 mg kg^{-1} 的干猪粪 3 kg,并和表层 2 cm 的土壤混合均匀,然后分别用 pH7 和 pH5 的自来水灌溉小区,使表面土壤全部潮透,呈淹水状态。分别于处理后第 5 天、第 10 天、第 20 天和第 30 天用土钻在小区不同位置钻取不同层次(0~10 cm, 10~20 cm, 20~30 cm, 30~50 cm)

的土样,分析土壤中磺胺二甲嘧啶的残留量。

1.4 微生物计数

细菌、真菌采用平板计数法^[8]。细菌用牛肉膏蛋白胨培养基。测定土壤在培养过程中可培养细菌、真菌数动态变化。

1.5 土壤中磺胺二甲嘧啶的测定

称取土壤样品 10.0 g 置 50 ml 聚丙烯具塞离心管中,加入二氯甲烷 10 ml,激烈震荡 10 min,振荡提取 30 min,10 000 g 离心 10 min,移取下层液体 5 ml 于另一离心管中,35 $^\circ\text{C}$ 水浴氮气吹干。用 1 ml 流动相溶解残渣,下层加水稀释至 5 ml,稀释液注入预先分别用 5 ml 甲醇和 5 ml 水处理的 AccuBOND II ODS-C18 固相萃取柱,再先后用 5 ml 水和 5 ml 5% 甲醇溶液淋洗,最后用 5 ml 甲醇洗脱,收集洗脱液,35 $^\circ\text{C}$ 水浴氮气吹干,用流动相溶解残渣,准确定容 0.5 ml,过 0.22 μm 滤头后供液相色谱测定。添加 0.05~15 mg kg^{-1} 标准液的平均回收率为 84.2%~102.5%。

色谱条件:色谱柱 ZORBAX SB-C18 为 5 μm , $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ (i. d.); 流动相为甲醇+1% 乙酸 (32+68); 流速 1.0 ml min^{-1} ; 检测器为二极管阵列检测器; 检测波长 270 nm。

1.6 数据统计

采用 SPSS10.0 统计软件,对不同处理组进行数据统计和显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 兽药抗生素磺胺二甲嘧啶对土壤中细菌和真菌数量的影响

土壤中细菌和真菌数量结果见表 1。从表中可见,土壤施入磺胺二甲嘧啶后,细菌和真菌的生长均受到了不同程度抑制,施入磺胺二甲嘧啶 7 d 后,土壤中细菌和真菌数量显著减少,在受试 35 d 时,细菌和真菌数量分别下降了 43.74% 和 43.55%,显著低于初始值 ($p < 0.05$),表明磺胺二甲嘧啶对土壤中的细菌和真菌有明显抑制或杀灭作用,这可能因为磺胺二甲嘧啶作为广谱性抗菌素,对革兰氏阳性菌和阴性菌均有明显的抑制作用^[5],但在此过程中,随着时间推移兽药对细菌和真菌生长的抑制程度减缓并有回升趋势,提示土壤中细菌和真菌对土壤中药物逐渐产生了适应。有关兽药抗生素对土壤细菌和真菌数量影响的报道很少,目前看到较多的是农药对土壤微生物的影响。报道认为杀虫农药对土壤中细菌数有微弱

的抑制作用, 而对土壤中的真菌数量有刺激增强作用^[9]。本结果与 Dijk 等^[10] 的研究相一致。

表 1 磺胺二甲嘧啶处理后土壤中细菌和真菌数量的动态变化 [log(CFU g⁻¹)]

Table 1 Effect of Sulfamethazine on populations of bacteria and fungi in soil [log(CFU g⁻¹)]

微生物类别 Microorganism	0	7 d	15 d	23 d	35 d
细菌数量 Bacteria population	7.355	5.534*	4.674*	4.342*	4.138*
真菌数量 Fungi population	4.850	3.497*	2.929*	2.542*	2.738*

* 表示与初始值差异显著 ($p < 0.05$) Means significant difference at 0.05 level

2.2 兽药抗生素磺胺二甲嘧啶在土壤中降解

磺胺二甲嘧啶在土壤中的降解曲线见图 1。由图看出, 磺胺二甲嘧啶在土壤中不易被降解, 在培养 80 d 后, 未灭菌土中药物被降解了 39.1%, 表明土壤微生物在磺胺二甲嘧啶降解过程中有一定的作用。研究药物在土壤中的降解最常用的是一级反应动力学方程, 即:

$$C = C_0 e^{-kt}, t_{0.5} = \ln 2 / k$$

表 2 磺胺二甲嘧啶在土壤中降解的动力学参数

Table 2 Kinetic parameter of degradation of sulfamethazine in the soil studied

处理 Treatment	回归方程 Regression equations	半衰期 $t_{0.5}$ Half life (d)	相关系数 r Regression coefficient
灭菌组 Sterilized soil	$C = 4.904e^{-0.0038t}$	223.9	0.996
未灭菌组 Unsterilized soil	$C = 4.453e^{-0.0043t}$	102.4	0.994

由表 2 可以看出, 磺胺二甲嘧啶在灭菌土壤中的半衰期为 223.9 d, 其在未灭菌土壤中半衰期为 102.4 d, 灭菌土壤中的半衰期是未灭菌土壤的 2.19 倍。可见土壤微生物对磺胺二甲嘧啶的降解发挥着重要作用。Thiele-Bruhn 等认为土壤微生物对该药物共代谢作用决定了该药物的降解^[11]。

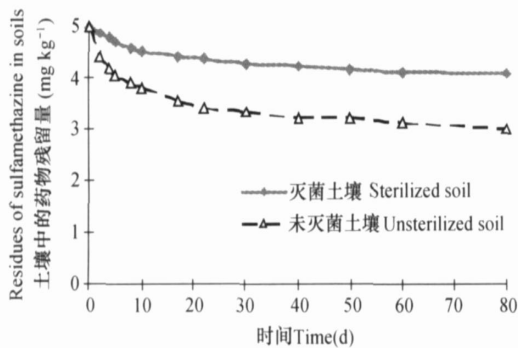


图 1 磺胺二甲嘧啶在土壤中的降解

Fig. 1 Degradation of sulfamethazine in sterilized and unsterilized soils

2.3 磺胺二甲嘧啶在土壤中的迁移

用试验土制作土壤薄板, 用经酸碱调节成不同

式中: C_0 为药物加入时土壤中的浓度, mg kg^{-1} ; C 为 t 时土壤中药物残留量, mg kg^{-1} ; k 为药物的降解速率常数; t 为培养时间, d; $t_{0.5}$ 为药物降解半衰期。

将实验所得数据代入动力学方程进行统计处理得其动力学参数如表 2 所示。

pH 值的去离子水作展开剂, 研究 pH 值对磺胺二甲嘧啶移动的影响, 实验结果见表 3。药物在土壤薄板上迁移的 R_f 值是药物在薄板上的平均移动距离 Z_p (cm) 与点样点 $Z_w = 15\text{cm}$ 的比值, 即:

$$R_f = Z_p / Z_w; Z_p = \sum Z_i M_i / \sum M_i$$

式中: i 为土壤薄板分割段数; Z_i 为第 i 段到原点的平均距离, cm; M_i 为每段薄层中药物含量, μg 。

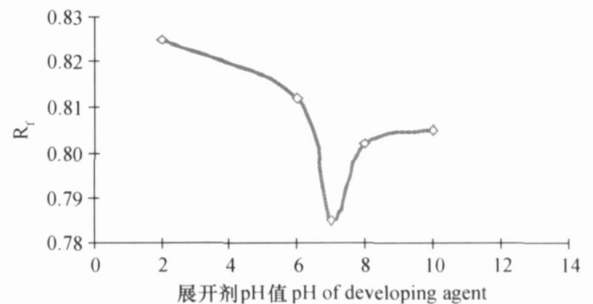


图 2 不同 pH 展开剂对磺胺二甲嘧啶在土壤中移动性的影响

Fig. 2 Effect of pH of developing agent on mobility of Sulfamethazine in soil

从图 2 不难看出, 磺胺二甲嘧啶在不同 pH 值的展开剂中有不同的移动速率, 在展开剂为中性的

条件下,磺胺二甲嘧啶在土壤中的 R_f 为 0.785, 介于 0.65 和 0.89 之间, 属于强移动性, 说明该药物在土壤中容易迁移。试验结果还表明, 当展开剂不论变为酸性还是碱性, 磺胺二甲嘧啶的迁移能力都有所增强。磺胺二甲嘧啶在土壤中的吸附主要是磺胺二甲嘧啶的功能基团在有机质上的吸附, 土壤粘土矿物的吸附量很小, 目前认为药物在土壤中的吸附有两种过程: 固相溶解和专性吸附^[12]。固相溶解即分配过程类似于有机物在有机溶剂中的溶解作用; 专性吸附即有机污染物通过某些化学键的作用结合在土壤有机质的某些特定位点上。非中性的展开剂使磺胺二甲嘧啶的吸附减弱, 可能由于磺胺二甲嘧啶含有伯胺基和磺酰胺基, 呈酸碱两性, 极性较高, 易溶于酸和碱溶液; 同时酸和碱也可能改变土壤有机质的性质, 两性的有机质胶体既可和酸反应, 也可和

碱反应, 可使土壤有机质中结合磺胺二甲嘧啶的特定位点数目变少, 引起化学结合作用的减弱, 阻碍了磺胺二甲嘧啶和有机质胶体间氢键的生成, 结果移动性加大。

2.4 磺胺二甲嘧啶在土壤中的渗漏

磺胺二甲嘧啶在田间的渗漏试验结果见表 3。由表 3 可见, 磺胺二甲嘧啶在田间施用后, 在土壤中会随水向下渗漏, 0~50 cm 的土层在用药后的 5~30 d 内均有磺胺二甲嘧啶残留检出, 浓度随时间而递减, 随土层深度增加而递进。磺胺二甲嘧啶随水在土壤中的渗漏受淹水 pH 的影响, 同一时间内药物在不同深度的土层中分布不同, 在 pH 为 5 时, 渗漏速度加快, 更易迁移至深层土壤, 说明, 磺胺二甲嘧啶在土壤中容易渗漏和迁移, 这可能会对地下水产生污染和危害。

表 3 磺胺二甲嘧啶在田间经不同 pH 水淋状态下的渗漏

Table 3 Leaching of sulfamethazine in soil with water different in pH (mg kg^{-1})

土层 Soil layer (cm)	pH= 7				pH= 5			
	5 d	10 d	20 d	30 d	5 d	10 d	20 d	30 d
0~ 10	6.271	3.186	1.984	1.348	6.107	2.956	1.674	1.248
10~ 20	2.184	3.213	2.342	1.896	2.784	3.542	1.894	1.434
20~ 30	0.341	1.204	2.719	2.467	0.936	1.507	3.467	2.328
30~ 50	LOD	0.621	1.246	2.135	0.097	1.498	2.518	3.129

3 结 论

1) 在试验条件下, 兽药抗生素磺胺二甲嘧啶对土壤中微生物有抑制和杀灭作用, 但随处理时间延长, 该抑制作用变弱, 提示土壤中微生物对药物产生了适应。

2) 磺胺二甲嘧啶在土壤中比较稳定, 不易被降解, 持留时间久, 在灭菌和非灭菌土壤中的半衰期分别为 223.9 d 和 102.4 d。

3) 磺胺二甲嘧啶在土壤中容易迁移和渗漏, 其移动性受展开剂和介质 pH 值影响, 在非中性环境下, 移动性增强, 会对地表水和地下水产生影响。

参 考 文 献

[1] Hirsch R, Ternes T, Haberer K, *et al.* Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment*, 1999, 225: 109~ 118

[2] Frick E A, Henderson A K, Moll D M, *et al.* Presence of pharmaceuticals in wastewater effluent and drinking water. *Metropolitan At-*

lanta, Georgia, July-September 1999. In: Hatcher K J. ed. Proceedings of the 2001 Georgia Water Resources Conference. Carl Vinson Institute of Government, The University of Georgia, Athens, GA, 282~ 282 Available from <http://ga.water.usgs.gov/nawqa/Phamr/final.pdf>

- [3] Koplin D W. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U. S. streams, 1999~ 2000. *A National Reconnaissance. Environmental Science and Technology*, 2002, 36(6): 1202~ 1211
- [4] Davidson J. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, 1999 (42): 73~ 91
- [5] 袁宗辉. 饲料药理学. 北京: 中国农业出版社, 2001. 151~ 154. Yuan ZH. *Veterinary Drugs Feed Additives (In Chinese)*. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2001. 151~ 154
- [6] Haller M Y, Muller R S, McArdeall C S, *et al.* Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2002, 952: 111~ 120
- [7] Burkhardt M, Stooß K, Stamm C, *et al.* Veterinary antibiotics in animal slurries A new environmental issue in grassland research. *Grassl. Sci. Eur.*, 2004, 9: 322~ 324
- [8] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 中国农业出版社, 1986. 314~ 317. Xu G H, Zheng H Y. *Manual of Analyses*

- for Soil Microorganisms (In Chinese). Beijing: Chinese Agricultural Press, 1986. 314~ 317
- [9] 朱南文, 胡茂林, 高廷耀. 甲胺磷对土壤微生物活性的影响. 农业环境保护, 1999, 18(1): 4~ 7. Zhu N W, Hu M L, Gao T Y. Effect of methamidophos on microbial activity in soil (In Chinese). Agr. environmental Protection, 1999, 18(1): 4~ 7
- [10] Dijk P V, van de Voorde H. Sensitivity of environmental microorganism to antimicrobial agents. Appl. Environ. Microbiol., 1976, 31: 332~ 336
- [11] Thiele Bruhn S, Seibicke T, Schulten H R. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle size fractions. J. Environ. Qual., 2004, 33: 1331~ 1342
- [12] Boxall A B A, Blackwell P, Cavallo R, *et al.* The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. Toxicol. Lett., 2002, 131: 19~ 28

ECOTOXICOLOGY AND ECOLOGICAL BEHAVIOR OF SULFAMETHAZINE IN SOIL

Wang Ran^{1,2} Liu Tiezheng² Geng Zhiming² Chen Ming² Wang Tian[†]

(1 College of Animal Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(2 Jiangsu Key Laboratory of Animal-Derived Food Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract Ecotoxicology of sulfamethazine on soil microbial activity and its degradation and transfer in the soil were investigated. Results show that 1 mg kg^{-1} concentration of sulfamethazine in soil resulted in an apparent decrease in populations of bacteria and fungi ($p < 0.05$). Moreover, sulfamethazine was observed hardly degrading in soil, with a half life of 223.9 d and 102.4 d in sterilized and unsterilized soil respectively. And the thin layer chromatogram and leaching test indicated that sulfamethazine was liable to transfer and get leached, with R_f being more than 0.7, and its transfer and leaching rates were subject to the impact of pH and increased in acidic and alkaline developing agents, suggesting that sulfamethazine, as veterinary antibiotic, is a new environmental contaminant strong in ecotoxicology and mobility, low in degradation rate in soil, thus posing a potential pollution risk to water bodies.

Key words Veterinary antibiotics; Sulfamethazine; Ecotoxicology; Ecological transfer